

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日 2001年12月 7日  
Date of Application:

出願番号 特願2001-374327  
Application Number:

ST. 10/C]: [JP2001-374327]

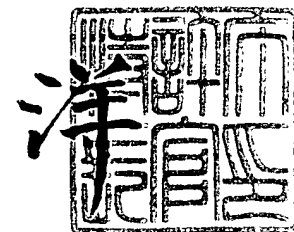
願 人 森永乳業株式会社  
Applicant(s):

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2004年12月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-1117

【提出日】 平成13年12月 7日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 1/00

【発明の名称】 ビフィドバクテリウム・ロンガム

【請求項の数】 4

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内

    【氏名】 外山 一吉

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内

    【氏名】 平松 明德

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内

    【氏名】 肖 金忠

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内

    【氏名】 高橋 典俊

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社 食品総合研究所内

    【氏名】 近藤 しずき

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社  
栄養科学研究所内

**【氏名】** 八重島 智子

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 神奈川県座間市東原五丁目 1 番 8 3 号 森永乳業株式会社  
栄養科学研究所内

**【氏名】** 高橋 幸子

**【特許出願人】**

**【識別番号】** 000006127

**【氏名又は名称】** 森永乳業株式会社

**【代理人】**

**【識別番号】** 100064908

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 志賀 正武

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100108578

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 高橋 詔男

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100089037

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 渡邊 隆

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100101465

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 青山 正和

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100094400

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 三義

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100107836

【弁理士】

【氏名又は名称】 西 和哉

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100108453

【弁理士】

【氏名又は名称】 村山 靖彦

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909134

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビフィドバクテリウム・ロンガム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 。

- (1) 乳性培地を pH4. 6 以下にする発酵性、
- (2) 乳性培地で pH4. 4 ~ 4. 6 に達した時に急冷して 1 0 ℃、2 週間保持した時の生残率が 5 0 % 以上である、
- (3) pH 3. 0 の人工胃液で 3 7 ℃、2 時間保温した時の生残率が 1 0 % 以上である耐胃酸性能。

【請求項 2】 菌株が、ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7 7 8 7 である請求項 1 に記載のビフィドバクテリウム・ロンガム。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載のビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する菌末

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 に記載のビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する飲食品。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、発酵性や、酸性条件下、流通過程での保存性に優れ、さらに胃酸耐性に優れ、生理機能を発揮し易い新規なビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) に関する。

また、本発明は、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する新規なビフィドバクテリウム・ロンガムの菌末及び飲食品に関する。

【0 0 0 2】

【従来技術及び発明が解決しようとする課題】

ビフィドバクテリウム・ロンガム等のビフィドバクテリウム属菌（以下、「ビフィズス菌」という）は、ヒトの腸管内で形成される腸内菌叢の優勢菌種の一つであって、その摂取により整腸作用を有することが知られている。近年、生活者

の健康志向の高まりと共に、ビフィズス菌を含む食品への需要も高まっており、発酵乳や乳酸菌飲料等に広くビフィズス菌が利用されている。また、抗腫瘍活性等、ビフィズス菌の有する生理作用についても、種々報告がなされており、各種健康食品への利用が試みられている。このように、腸内菌叢の維持や改善等、ビフィズス菌の効果が期待されているが、このような効果をビフィズス菌に発揮させるためには、ビフィズス菌を継続的に摂取することが必要とされている。

#### 【 0 0 0 3 】

しかし、ビフィズス菌は、乳性成分培地における増殖性が良くなく、一定の pH 及び菌数に到達するまで長時間の発酵を要する。また、ビフィズス菌は、酸性条件下での保存が難しく、死滅し易いため、ビフィズス菌を用いた発酵乳製品は、流通過程で菌数の維持が大きな課題である。

#### 【 0 0 0 4 】

一方、ビフィズス菌の生理作用の発揮には生きている菌がもっとも効果的であるとされているが、ヒト消化管内には、乳酸菌やビフィズス菌にとって様々な死滅要因や生育阻害要因が存在している。特に、消化管の最初の関門である胃に到達した時に、胃液の低い pH 及び消化酵素の洗礼を受けなければならない。胃内の内容物などの状況によるが、一般的に pH 3. 0 で 2 時間生きることが胃酸耐性の 1 つの基準とされている（伊藤ら、日畜会報、6 3 巻、1 2 号、1 2 7 6 - 1 2 8 9 頁、1 9 9 2 年）。

#### 【 0 0 0 5 】

しかし、ビフィズス菌の殆どは、低い pH に弱く、乳酸桿菌などに較べて胃液を通過する確率が低いとされている。

#### 【 0 0 0 6 】

したがって、ビフィズス菌を含有する飲食品を開発するに際しては、短時間で一定量以上増殖させることができ（発酵性）、製造後の流通及び消費の過程で一定量以上の生菌数を維持でき（耐酸性）、さらに胃酸耐性能を有し、生きたまま消化管（特に腸管）に到達して生理作用を発揮し得るビフィズス菌の開発が望まれている。

#### 【 0 0 0 7 】

このような点から、ビフィズス菌の発酵性、耐酸性及び胃酸耐性の研究がなされている。例えば、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*Bifidobacterium bifidum*) について耐酸性や乳性培地中での発酵性を有する変異株の存することが知られている(特公昭56-42250号公報)。また、ビフィドバクテリウム・ロンガムについて耐酸性を有する菌株が知られている(特公昭59-53829号公報(以下引用文献1と記載する)、特開平11-75830号公報)。さらに、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)が還元脱脂乳培地中で増殖し、さらに耐酸性を有することが知られている(特開平4-320642号公報)。

#### 【0008】

しかし、前記既報のビフィドバクテリウム・ビフィダム及びビフィドバクテリウム・ブレーベは、乳性培地中で所定pHまで発酵するには15時間以上の長時間を要する。また、耐酸性菌株の多くも、酸性乳製品又は果汁製品中(pH4.0~4.8)において冷蔵保管した生残率は、必ずしも十分満足できるものとはいえない。即ち、前記菌株は胃酸耐性が十分ではなかった。また、消化管(腸管)内での生残性に関係のあるとされている胃酸耐性の強いビフィドバクテリウム・ロンガムの変異株の報告もあるが(特開平9-322762号公報、以下引用文献2と記載する)、この菌株は後記する試験の結果等からも明らかであるように、酸性乳製品中での保存性が十分ではなかった。

#### 【0009】

したがって、本発明は、乳性培地中で増殖性がよく、耐酸性を有し、発酵乳製品中で一定数以上の菌数が確保しやすく、また保存流通中でも菌数の維持ができ、かつ胃酸耐性が強く、生きて消化管(腸管)まで到達し、生理機能を発揮しやすいビフィズス菌を提供することを目的とする。

また、本発明は、かかるビフィズス菌を含有する菌末及び飲食品を提供することを目的とする。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、(1)乳性培地をpH

4. 6 以下にする発酵性、(2) 乳性培地で pH 4. 4 ~ 4. 6 に達した時に急冷して 1 0 °C、2 週間保持した時の生残率が 5 0 % 以上である、(3) pH 3. 0 の人工胃液で 3 7 °C 2 時間保温した時の生残率が 1 0 % 以上である耐胃酸性能、を有するビフィドバクテリウム・ロンガムであれば、短時間で一定量以上増殖させることができ、製造後の流通及び消費の過程で一定量以上の生菌数を維持でき、さらに胃酸耐性能を有し、生きたまま消化管（特に腸管）に到達して生理作用を発揮し得ることを見出し、本発明を完成した。

#### 【0 0 1 1】

すなわち、本発明は、下記の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガムを提供するものである。

- (1) 乳性培地を pH 4. 6 以下にする発酵性、
- (2) 乳性培地で pH 4. 4 ~ 4. 6 に達した時に急冷して 1 0 °C、2 週間保持した時の生残率が 5 0 % 以上である、
- (3) pH 3. 0 の人工胃液で 3 7 °C で 2 時間保温した時の生残率が 1 0 % 以上である耐胃酸性能。

また、本発明は、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する菌末を提供するものである。

また、本発明は、かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する飲食品を提供するものである。

#### 【0 0 1 2】

##### 【発明の実施の形態】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、上記 (1)、(2)、(3) の特性を有するものである。

(1) は、発酵性に関するものである。ビフィズス菌は、一般に乳性成分培地における増殖性が弱く、一定の pH、菌数に到達するまで長時間の発酵が必要である。乳性培地にて、pH を 4. 6 以下にすることができる強い発酵力を有する菌であれば、発酵を短時間で行うことができ、これを用いた飲食品（発酵乳製品等の酸性乳製品、果汁製品等）中で一定菌数（例えば発酵乳製品 1 mL 当たり 1 0 0 0 万個）を容易に確保することができ、製造効率が向上する。



## 【0 0 1 3】

(2) は、ビフィズス菌を用いた発酵乳製品の保存中又は流通中において、一定の菌数を維持できる耐酸性に関するものである。一般に、酸性乳製品又は果汁製品の pH は、4. 0 ~ 4. 8 であり、その品質保持期限は、1 0℃以下の保存条件で、2 週間程度であることが一般的である。本発明者らは、乳性培地を用いて培養し、pH 4. 4 ~ 4. 6 に達した時に急冷して 1 0℃、2 週間保持した時の生残率が 5 0 % 以上ある菌であれば、耐酸性が強く、品質保持期限内の酸性乳製品等において、一定の生菌数を確保することができることを見出した。これに対して、例えば pH 4 のクエン酸やリンゴ酸緩衝液中で、1 0℃、4 日間保存したときの残存率が 5 % 以上の菌では、かならずしも十分な耐酸性を有するとはいえない。なお、乳性培地とは、牛乳、生クリーム、バター、脱脂乳等の乳成分を培地とし、乳蛋白質を 3 % 以上含有した培地をいう。

(3) は、ビフィズス菌が生きて消化管（腸管）に到達するための胃酸耐性に関するものである。ビフィズス菌は、経口摂取後、胃を通過した後、腸管に達してその生理機能を発揮する。しかし、胃酸は pH が低いため、胃中で大部分の菌は死滅してしまい、腸管に到達できる菌は少ない。pH 3. 0 の人工胃液で 3 7℃ 2 時間保温した時の生残率が 1 0 % 以上であれば、耐胃酸性能が高く、多くの菌が生きて腸管に到達することができると考えられる。

上記 (1) ~ (3) の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガムを摂取することにより、多くの菌が生きて腸管に到達することができ、ビフィズス菌としての生理機能が発揮され易い。

## 【0 0 1 4】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、例えば以下の方法により得ることができる。まず、各種の試料から菌株を分離し、この中から乳性培地での発酵性が優れたもの、すなわち乳性培地を pH 4. 6 以下にする発酵性を有するものを選択する。次いで、選択された菌をスターターとして発酵乳製品を調製し、低温保存中で生残性の優れた菌株、すなわち乳性培地を用いて培養し、pH 4. 4 ~ 4. 6 に達した時に急冷して 1 0℃、2 週間保持した時の生残率が 5 0 % 以上である菌株を選出する。さらに、かかる菌株を pH 3. 0 の人工胃液で 3 7℃ 2

時間保温し、生残率が 1 0 % 以上である胃酸耐性の優れた菌株を選択することにより得ることができる。

### 【 0 0 1 5 】

以下、さらに詳細に説明する。

#### 1. 菌株の取得

本発明者らは、前記の性質を有する菌株を自然界から取得すべく、自然界から採集したサンプルを嫌気性希釈液（1 9 8 0 年叢文社発行、光岡知足著「腸内菌の世界」3 2 2 ページ。以下、参考文献 1 と記載する。）で希釈し、B L 寒天培地（前記参考文献 1、3 1 9 ページ）の平板に塗布し、3 7 ℃で嫌気培養した。そして得られたコロニーの中でビフィズス菌特有の形態を示し、かつ塗布標本の顕微鏡観察によりグラム陽性であり、棒状、棍棒状又は分岐状の菌形を示す菌を釣菌し B L 寒天平板に画線塗布し、前記と同様の方法で嫌気培養を反復し、純粹単離された菌株を得た。これらの菌株を下記の試験方法を用いて、まず発酵試験及び保存中での生残性試験を行ない、それらに優れた性質をもつ菌株を 2 0 株あまり得た。続いて、胃酸耐性試験を行ない、p H 3 . 0 の人工胃液中で優れた生残性を示した株を取得した。そのなかで、最も優れた菌株を、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに F E R M B P - 7 7 8 7 として寄託した。該菌株の菌学的性質を以下に示す。

### 【 0 0 1 6 】

#### 2. 菌学的性質

（1）菌形（B L 寒天培地で 3 7 ℃、7 2 時間嫌気培養したときの光学顕微鏡観察時）

大きさ：0 . 3 ~ 0 . 8  $\mu$  m  $\times$  4 ~ 1 0  $\mu$  m

形 状：多形性を示す桿菌（こん棒状、Y 字状等）

（2）グラム染色性：陽性

（3）コロニー形態（B L 寒天培地で 3 7 ℃、7 2 時間嫌気培養したとき）

形 状：円形隆起～半球状に隆起

周 縁：円滑

大さ：1 ~ 4 mm

色 調：周縁暗褐色、中心濃褐色

表 面：円滑

(4) 芽胞形成：陰性

(5) ガス生成：なし

(6) 運動性：なし

(7) カタラーゼ活性：陰性

(8) 酢酸／L (+) 乳酸モル比： 1 . 5 以上

#### 【0 0 1 7】

(9) 糖の発酵性 光岡の糖発酵性用培地（前記参考文献1、323ページ）を用いてAPI 50CHシステム（日本バイオメリュー株式会社）により実施した。

L-アラビノース、D-キシロース、ガラクトース、D-グルコース、D-フラクトース、D-マンノース、マルトース、ラクトース、メリビオース、シュクロース、メレチトース、ラフィノース、D-ツラノースは陽性； $\alpha$ -メチルグルコシドは遅れて陽性；

グリセロール、エリスリトール、D-アラビノース、リボース、L-キシロース、アドニット、メチリキシロシド、L-ソルボース、ラムノース、ダルシット、イノシット、マンニット、ソルビット、 $\alpha$ -メチルマンノシド、N-アセチルグルコサミン、アミグタリン、アルブチン、エスクリン、サリシン、セロビオース、トレハロース、イヌリン、スターチ、グリコーゲン、キシリトール、ゲンチオビオース、D-リキソース、D-タガトース、D-フコース、L-フコース、D-アラビトール、L-アラビトール、グルコネート、2-ケトグルコネート、5-ケトグルコネートは陰性。

#### 【0 0 1 8】

(10) DNAの相同性

ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC 15707<sup>T</sup>及びビフィドバクテリウム・アニマリス(Bifidobacterium animalis) R101-8<sup>T</sup>（理化学研究所微生物系統保存施設にてJCM1190<sup>T</sup>として入手可能。）の染色体DNAをそれぞれ抽出し、ビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787か

ら抽出した染色体DNAとマイクロプレートハブリダイゼーション法によりハイブリダイゼーションを行った。ビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787から抽出した染色体DNAは、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC 15707から抽出した染色体DNAに対して95%の相同性を示し、ビフィドバクテリウム・アニマリスR101-8<sup>T</sup>との相同性は22%であった。

#### 【0019】

以上、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787は、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology、vol. 2, 1986の分類基準に示されるビフィズス菌と合致しており、また、糖発酵性、性状及びDNAの相同性の結果によりビフィドバクテリウム・ロンガムであると同定された。

#### 【0020】

### 3. 乳性培地での発酵性

0.2%酵母エキス(Difco社製)を配合した11%還元脱脂粉乳培地を115℃、15分で滅菌し、同培地で2回継代培養したビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787及び対照株のスターターを5%接種し、37℃で6時間培養した。培養液のpH及び菌数を測定した。菌数測定はRCA(Reinforced Clostridial Agar, Oxoid社製)平板で行なった。本培養条件で、ビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787は、対照株に比較して、短時間で乳性培地を凝固させることができ、ビフィズス菌数も最も高かった(表1)

。

#### 【0021】

【表 1】

各菌株の乳性培地における発酵性

菌 株	pH	CFU/ml
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	4.56	$2.1 \times 10^9$
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-6548	5.02	$7.3 \times 10^8$
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15707	5.88	$1.9 \times 10^8$
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15708	5.82	$9.3 \times 10^7$
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817	5.64	$4.7 \times 10^8$

ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548:引用文献1記載菌株  
 ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817:引用文献2記載菌株

## 【0022】

## 4. 耐酸性

## (1) 単独発酵

前記0. 2%酵母エキス (Difco社製) を配合した11%還元脱脂粉乳培地をガラス試験管に入れ、115℃、15分滅菌し、ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787及び対照株(表2において本菌株以外の菌株)の

スターターを 5 % 接種し、3 7 ℃で p H が 4 . 3 ~ 4 . 4 になるまで発酵させた後、急冷し、1 0 ℃で保存試験を行なった。急冷直後、保存 1 週間後及び 2 週間後の菌数を R C A 寒天平板で測定し、各期間保存後における生残率を算出した。ビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 は、p H 4 . 4 まで発酵した培地において、1 0 ℃で 2 週間保存しても殆ど生き残っており、非常に高い生残性を示し、対照株ビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M P - 6 5 4 8 に比べて優れている（表 2）。胃酸耐性を有することが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム A T C C 5 5 8 1 7 及び他の対照株は 2 週間保存後殆ど生き残っていなかった。

【 0 0 2 3 】

【表 2】

各菌株の乳性培地における生存性

菌 株	急冷直後			保存 1 週間			保存 2 週間		
	発酵時間	pH	菌 数 /ml	pH	菌 数 /ml	生存率 (%)	pH	菌 数 /ml	生存率 (%)
ビフアイドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	7.0	4.40	$1.8 \times 10^9$	4.31	$1.9 \times 10^9$	105.5	4.30	$1.7 \times 10^9$	92.1
ビフアイドバクテリウム・ロンガム RM P-6548	14.0	4.44	$1.5 \times 10^9$	4.38	$1.2 \times 10^9$	80.4	4.35	$7.5 \times 10^8$	50.1
ビフアイドバクテリウム・ロンガム ATCC15707	14.5	4.42	$2.2 \times 10^9$	4.37	$6.0 \times 10^7$	1.8	4.33	$2.0 \times 10^7$	0.56
ビフアイドバクテリウム・ロンガム ATCC15708	14.0	4.41	$1.0 \times 10^9$	4.40	$1.0 \times 10^8$	10.1	4.40	$6.0 \times 10^5$	0.06
ビフアイドバクテリウム・ロンガム ATCC55817	14.0	4.38	$1.9 \times 10^9$	4.35	$7.0 \times 10^7$	2.8	4.34	$1.5 \times 10^5$	0.01

ビフアイドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548:引用文献1記載菌株  
 ビフアイドバクテリウム・ロンガム ATCC55817:引用文献2記載菌株

【0024】

(2) 混合発酵

後記実施例 1 と同様組成の乳脂肪 3. 0 % (W/W)、無脂乳固形分 9 % (W/W) からなる生乳ベースを、7 0 °C に加温し、1 5 M P a の圧力で均質し、9 0 °C で 1 0 分間殺菌し、4 0 °C に冷却した。この殺菌したベースに、後記実施例 1 記載の方法で調製したストレプトコッカス・サーモフィルス (*Streptococcus thermophilus*) とラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクス (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) の混合カルチャー 0. 6 % を接種した。さらに、前記 0. 2 % 酵母エキス (Difco 社製) を配合した 1 1 % 還元脱脂粉乳培地で、3 7 °C で p H が 4. 3 ~ 4. 4 になるまで培養したビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 及び対照株 (表 3 において本発明菌以外の菌株) のスターターをそれぞれ 5 % 接種し、試験管に分注し、3 7 °C で 5 時間培養し、急冷し 1 0 °C で保存試験を行なった。急冷直後、保存 1 週間後及び 2 週間後の菌数を R C A 寒天平板で測定し、保存における生残率を算出した。ビフィドバクテリウム・ロンガム F E R M B P - 7 7 8 7 は、p H 4. 6 以下まで発酵した発酵乳において、1 0 °C で 2 週間保存しても 5 0 % 以上が生き残っており、胃酸耐性を有していることが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム A T C C 5 5 8 1 7 及び他の対照株に比べて耐酸性がすぐれている (表 3)。

【 0 0 2 5 】



【表 3】

各菌株の乳性培地における生残性

菌 株	急冷直後		保存 1 週間			保存 2 週間		
	pH	菌 数 /mL	pH	菌 数 /mL	生残率 (%)	pH	菌 数 /mL	生残率 (%)
ビフイドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	4.59	$3.3 \times 10^8$	4.20	$2.5 \times 10^8$	75.8	4.18	$1.7 \times 10^8$	51.5
ビフイドバクテリウム・ロンガム RM P-6548	4.57	$2.5 \times 10^8$	4.23	$8.0 \times 10^7$	32.1	4.18	$7.5 \times 10^7$	30.0
ビフイドバクテリウム・ロンガム ATCC15707	4.60	$2.1 \times 10^8$	4.26	$2.5 \times 10^6$	1.20	4.17	$2.0 \times 10^3$	<0.001
ビフイドバクテリウム・ロンガム ATCC15708	4.63	$1.7 \times 10^8$	4.27	$<1.0 \times 10^4$	<0.01	4.18	$<1.0 \times 10^3$	<0.001
ビフイドバクテリウム・ロンガム ATCC55817	4.54	$2.2 \times 10^8$	4.28	$7.1 \times 10^6$	3.20	4.16	$<1.0 \times 10^3$	<0.001

ビフイドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548:引用文献1記載菌株

ビフイドバクテリウム・ロンガム ATCC55817:引用文献2記載菌株

【0026】

## 5. 胃酸耐性

胃酸耐性試験は以下の通りに実施した。すなわち、ろ過滅菌した1M塩酸で pH 3. 0 に調製した人工胃液〔0. 2 % NaCl、0. 3 5 % ペプシン（1 : 5 0 0 0）を精製水で溶解〕 9. 9 ml に、Briggs liver broth（光岡知足；臨床検査、1 8 巻、1 1 6 3 ~ 1 1 7 2 ページ、1 9 7 4 年）で 2 回賦活培養（3 7 °C、2 4 時間）し、生理食塩水で 1 回洗浄したビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7 7 8 7 及び対照株の菌体懸濁液 0. 1 ml を添加した。3 7 °C で 2 時間接触後、1 ml を pH 6. 5 のリン酸緩衝液（6 7 mM）9 ml に添加し反応を停止させた。次に、初発菌数及び人工胃液に接触後の菌数を RCA 寒天平板を用いて計測し、生残率を算出した。本法により本発明の FERM BP-7 7 8 7 株は ATCC 5 5 8 1 7 株と同レベルで高い胃酸耐性を示し、他の菌株は、比較的耐酸性を有する FERM P-6 5 4 8 を含めて殆ど耐性を示さなかった(表 4)。

【0 0 2 7】

【表 4】

各菌株の人口胃液耐性		
菌 株	初菌数(CFU/ml)	2 時間処理後の生残率 (%)
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787(本発明菌)	$5.1 \times 10^8$	23.5
ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-6548	$2.5 \times 10^8$	0.01
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15707	$4.1 \times 10^8$	0.01
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC15708	$1.1 \times 10^8$	0.00
ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817	$2.8 \times 10^8$	21.3

ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM P-6548:引用文献1記載菌株  
 ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC55817:引用文献2記載菌株

## 【0028】

以上のように、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株は、乳性培地中で強い発酵性及び酸性下での保存中において優れた生残性を有し、さらに人工胃液に対して強い耐性を示すことから、ビフィドバクテ

リウム・ロンガムの基準株又は今まで公知の菌株に見られなかった性質を持っていることがあきらかである。一方、胃酸耐性を有することが知られている ATCC 55817 株は、乳性培地中での発酵性、酸性下での保存中における生残性は極めて悪く、本発明の FERM BP-7787 株に比較して著しく劣っていた。

#### 【0029】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、自然界から分離したビフィドバクテリウム・ロンガムの中から、発酵性、耐酸性及び耐胃酸性能を有するものを選び出し得られたものである。したがって、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、短時間で迅速に培養することができ、培養物又はその加工物の保存中における生菌数の低下が少なく、広い pH 域の飲食物への利用が可能である。また、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、凍結や凍結乾燥したときの生残率も優れていることが試験で確認されているので、菌末の形態で用いることもできる。さらに、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、胃酸耐性能を有し、人又は動物の体内に摂取された場合、高い確率で生きて消化管（腸管）に到達し、生理機能を発揮し得るため、産業上きわめて有用である。例えば、古くから知られている人や動物の医薬品としての整腸剤に使用することは勿論、粉末状の食品、飼料あるいは液状又は半固形状の飼料、食品に添加あるいは混在させることもできる。

#### 【0030】

以下に実施例を示し、本発明をさらに詳細に説明する。

#### 【0031】

##### 実施例1

酵母エキス 0.2% (W/W)、脱脂粉乳 11% (W/W) からなる 90℃、30分殺菌後の培地 1000 ml に、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株を接種し、37℃ 6時間培養した。一方、10% (W/W)還元脱脂乳培地 1500 ml を 90℃、30分間殺菌し、ストレプトコッカス・サーモフィルス（ハンセン社製）及びラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクス（ハンセン社製）の混合カルチャー 50 m

1 を接種し、42℃で5時間培養した。

これとは別に乳脂肪3.0% (W/W)、無脂乳固形分9% (W/W) からなる生乳50Lを70℃に加温し、15MPaの圧力で均質し、90℃で10分間殺菌し、40℃に冷却した。この殺菌したベースに、前記の通り前培養した本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株のカルチャー750ml及びストレプトコッカス・サーモフィルスとラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクスとの混合カルチャー300mlを接種し、500ml容の容器に充填し、密封し、37℃で5時間培養し、直ちに冷却した。得られた発酵乳は、乳酸酸度0.81%、pH4.55であり、ビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株 $2.3 \times 10^8$ /ml、ストレプトコッカス・サーモフィルス $6.8 \times 10^8$ /ml、ラクトバチルス・デルブリュッキイ・サブスピシーズ・ブルガリクス $3.4 \times 10^7$ /mlを含有していた。この発酵乳を10℃で14日間保存した時のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787の菌数は $1.5 \times 10^8$ /mlであり、生残率は65%であった。

### 【0032】

#### 実施例2

肉エキス50g、酵母エキス100g、ペプトン100g、乳糖200g、 $K_2HPO_4$  50g、 $KH_2PO_4$  10g、シスチン4g及び水9.5Lの組成からなる培地で、37℃、16時間前培養した本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムFERM BP-7787菌株のシードカルチャー500mlを、前記の培地10Lに接種し、37℃で16時間培養した。更に、90℃で30分殺菌した前記培地と同一組成の培地200Lに、前記培養液全量(10.5L)を接種し、37℃で16時間培養した。培養後の生菌数は $3.0 \times 10^9$ /mlであった。

次いで、シャープレス型遠心分離機(15000rpm)により菌体を集め、培地に同量の90℃、30分間殺菌の生理食塩水に再懸濁し、前記と同様遠心分離して再度集菌した。得られた菌体を脱脂粉乳10% (W/W)、蔗糖1% (W/W)、グルタミン酸ソーダ1% (W/W) からなる溶液(90℃30分殺菌)

20 L に懸濁し、常法に従って凍結乾燥し、 $1.6 \times 10^{10}/g$  の本菌を含む粉末約 2.2 kg を得た。

### 【0033】

#### 実施例 3

乾燥殺菌した澱粉 14 kg 及び乳糖 6 kg に、実施例 2 で得られた本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株を含む粉末 20 g を加えて均一に混合し、 $10^8/g$  の本菌を含有する粉末の整腸剤約 20 kg を得た。

### 【0034】

#### 実施例 4

酵母エキス 0.2 % (W/W) , 脱脂粉乳 11 % (W/W) からなる 90℃、30 分殺菌後の培地 1000 ml に、本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株を接種し、37℃、6 時間培養した。一方、酵母エキス 0.6 % (W/W) 入り 10 % (W/W) 還元脱脂乳培地 1000 ml を 90℃、30 分間殺菌し、ストレプトコッカス・クレモリス (Streptococcus cremoris、ハンセン社製) のカルチャー 30 ml を接種し、30℃で 16 時間培養した。

これとは別に、乳脂肪 0.5 % (W/W) 、無脂乳固形分 8.5 % (W/W) 、蔗糖 6.5 % からなる生乳 50 L を 70℃に加温し、15 MPa の圧力で均質化処理し、90℃で 10 分間殺菌し、40℃に冷却した。この殺菌したベースに、前記の通り前培養を行った本発明のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株のカルチャー 750 ml 及び前記の通り前培養を行ったストレプトコッカス・クレモリスのカルチャー 500 ml を接種し、30℃で 16 時間培養し、直ちに攪拌冷却した。冷却発酵乳を 15 MPa の圧力で均質化処理し、200 ml 容のガラス容器に充填し、密封し、ドリンクヨーグルトを得た。得られた発酵乳は乳酸酸度 0.70 %、pH 4.55 であり、ビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-7787 菌株  $1.5 \times 10^8/ml$  、ストレプトコッカス・クレモリス  $9.8 \times 10^8/ml$  を含有していた。この発酵乳を 10℃で 14 日間保存した時のビフィドバクテリウム・ロンガム FERM BP-

7 7 8 7 菌株の菌数は  $8.5 \times 10^7 / \text{ml}$  であり生残率は 5 7 % であった。

【 0 0 3 5 】

【発明の効果】

本発明のビフィドバクテリウム・ロンガムは、乳性成分培地において高い発酵性及び生残性、さらに胃液に対して強い耐性を有する。したがって、本発明菌の培養物の調製は短時間で迅速にでき、培養物又はその加工物の保存中における生菌数の低下が少なく、広い pH 域の飲食物への利用が可能である。さらに本発明菌は、胃酸耐性能を有し人又は動物の体内に摂取された場合、高い確率で生きて消化管（腸管）に到達し、生理機能を発揮することが考えられ、産業上きわめて有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 発酵性、耐酸性及び耐胃酸性能を有するビフィズス菌の新規菌株の提供；かかる新規菌株を含有する菌末、飲食品の提供。

【解決手段】 下記の菌学的性質を有するビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)。 (1) 乳性培地を pH 4.6 以下にする発酵性、 (2) 乳性培地で pH 4.4 ~ 4.6 に達した時に急冷して 10℃、2 週間保持した時の生残率が 50 % 以上である、 (3) pH 3.0 の人工胃液で 37℃ 2 時間保温した時の生残率が 10 % 以上である耐胃酸性能；かかるビフィドバクテリウム・ロンガムを含有する菌末、飲食品。

【選択図】 なし



## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2001-374327
受付番号	50101800976
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成 13 年 12 月 10 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000006127
【住所又は居所】	東京都港区芝 5 丁目 3 3 番 1 号
【氏名又は名称】	森永乳業株式会社

## 【代理人】

申請人

【識別番号】	100064908
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 OR ビル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	志賀 正武

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100108578
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 OR ビル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	高橋 詔男

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100089037
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 OR ビル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	渡邊 隆

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100101465
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 OR ビル 志賀国際特許事務所
【氏名又は名称】	青山 正和

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100094400
【住所又は居所】	東京都新宿区高田馬場 3 丁目 2 3 番 3 号 OR ビル 志賀国際特許事務所

次頁有

## 認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】 鈴木 三義  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100107836  
【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビ  
ル 志賀国際特許事務所  
【氏名又は名称】 西 和哉  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100108453  
【住所又は居所】 東京都新宿区高田馬場3丁目23番3号 ORビ  
ル 志賀国際特許事務所  
【氏名又は名称】 村山 靖彦

次頁無

特願 2 0 0 1 - 3 7 4 3 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 0 0 6 1 2 7 ]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 9 月 6 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区芝 5 丁目 3 3 番 1 号
氏 名	森永乳業株式会社